مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و هشتم/ شماره ۱۰۶/ خرداد ۱۳۸۹
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۵ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۹

بررسی اثرات پروتئین‌های سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس بر روی الگوی ترشحی Th1 و Th2 در موش Balb/C

رزیتا حیدری[۱]، دکتر محمد حسین یادگاری[۲]، دکتر شهلا رودبار محمدی[۲]، مریم رودباری[۱]

خلاصه

مقدمه: عفونت‌های قارچی در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی، گیرندگان مغز استخوان و افراد دیابتیک شیوع چشم‌گیری پیدا کرده است. چنانچه هر عاملی موجب افزایش تحریک سلول‌های ایمنی گردد، می‌تواند به عنوان عوامل تقویت کننده‌ی سیستم دفاعی و در طراحی‌های مدل واکسن مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق از پروتئین‌های سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس جهت تحریک سلول‌های لنفوسیتی استفاده شد.

روش‌ها: سوش مخمری کاندیدا آلبیکنس بر روی محیط GYEP کشت داده شد. سپس مخمرها به طور جداگانه از محیط کشت جمع آوری و با استفاده از گلوله‌ی شیشه‌ای ریز خرد شد. سوسپانسیون حاصل با دور g × ۱۰۰.۰۰۰ به مدت یک ساعت سانتریفیوژ و مایع رویی حاوی عصاره‌ی سیتوپلاسمی جدا شد. برای تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها از الکتروفورز و به منظور خالص سازی بیشتر و تهیه‌ی قطعات سیتوپلاسمی از ژل فیلتراسیون G200 استفاده شد. موش‌های Balb/c به پنج گروه تقسیم شدند: دو گروه به ترتیب با سلول‌های فعال و غیر فعال (هر دو گره همراه با ادجوانت) و سه گروه دیگر به ترتیب با ادجوانت کامل، ادجوانت ناقص و سرم فیزیولوژی حساس شدند. هفت روز پس از آخرین تزریق، موش‌ها کشته و طحال آن‌ها جدا شد. سپس سوسپانسیون لنفوسیتی تهیه و در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با آنتی‌ژن‌های به دست آمده از ژل فیلتراسیون مجاور شد. بعد از ۷۲ ساعت، مایع رویی کشت لنفوسیت‌ها، جهت بررسی الگوی ترشحی جمع‌آوری و با تست ELISA مقادیر INF-γ و IL-4 اندازه‌گیری شد. به منظور سنجش تحریک لنفوسیت‌ها از تست MTT نیز استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس تست MTT، در گروه‌های آزمون با سوش کاندیدا تحریک لنفوسیتی صورت پذیرفت و گروه‌های حساس شده با سلول‌های فعال (Active) شاخص تحریکی بالایی داشت. بر اساس تست ELISA پروتئین‌های سیتوپلاسمی استخراج شده‌ی کاندیدا آلبیکنس پاسخ‌های ایمنی سلولی را به سمت Th1 متمایل می‌نماید.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که پروتئین‌های سیتوپلاسمی استخراج شده می‌تواند به عنوان یک ماده‌ی پیشنهادی جهت بررسی‌های کامل در خصوص روش‌های تهیه‌ی مواد برای تأمین سیستم ایمنی مقاوم همراه با مصونیت یا پیش‌گیری از عفونت‌های کاندیدایی، به ویژه در بیماران ایدزی و سرطانی مورد بهره برداری قرار گیرد.

واژگان کلیدی: کاندیدا، پروتئین‌های سیتوپلاسمی، الگوی ترشحی سایتوکاین‌ها.

مقدمه

کاندیدا آلبیکنس شایع‌ترین عامل عفونت‌های قارچی جلدی- مخاطی می‌باشد و بیماری‌های ناشی از آن در همه‌ی نقاط جهان شیوع دارد. جنس کاندیدا در رده‌ی بلاستومایست‌ها قرار دارد. این رده، مخمرهایی هستند که به وسیله‌ی عمل جوانه زدن تکثیر می‌یابند. از نظر تکثیر جنسی، عده‌ای در دسته آسکومایکوتا قرار دارند و برای برخی تا کنون مرحله‌ی جنسی شناخته نشده است. گونه‌های مختلف کاندیدا به صورت همزیست در مجاری گوارشی و یا سایر نواحی بدن وجود دارند

[۱] کارشناس ارشد قارچ شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۲] استادیار، گروه قارچ شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمد حسین یادگاری، استادیار، گروه قارچ شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
Email: yadegarm@modares.ac.ir

www.mui.ac.ir

و در شرایطی که مقاومت میزبان به صورت موضعی یا سیستمیک دچار اختلال شده باشد، به صورت پاتوژن عمل می‌کنند. در واقع این قارچ‌ها به عنوان عوامل قارچی فرصت طلب در انسان محسوب می‌شوند (۱).

کاندیدیازیس عفونت اولیه یا ثانویه‌ای است که توسط گونه‌های جنس کاندیدا و به طور اعم، کاندیدا آلبیکنس ایجاد می‌گردد. سیر بالینی این عارضه به اشکال حاد، تحت حاد یا مزمن و اسپورادیک دیده می‌شود. عفونت ممکن است منحصر به دهان، گلو، پوست، واژن، انگشتان، ناخن‌ها، نای، ریه یا دستگاه گوارش باشد و یا به صورت سیستمیک همراه با سپتی‌سمی، اندوکاردیت و منتژیت مشاهده شود. واکنش پاتولوژیک نیز به اشکال مختلف وجود دارد و از یک تحریک و التهاب ساده تا یک واکنش گرانولومایی حاد یا مزمن متغیر است (۱).

کاندیدا آلبیکنس دارای آنتی‌ژن‌های متنوعی در دیواره‌ی سلولی و سیتوپلاسم می‌باشد؛ مانان، شاخص‌ترین آنتی‌ژن دیواره سلولی است که شکل منفرد آن در ساختمان دیواره‌ی سلولی وجود ندارد و در اتصال کووالان با پروتئین‌ها دیده می‌شود (۲). آنتی‌ژن‌های ساختاری یا آنتی‌ژن‌های ترشحی در محیط، پروتئین‌هایی هستند که در شرایط In-vitro از سلول کاندیدا به درون محیط کشت ترشح می‌شوند. این پروتئین‌ها به طور معمول از مایع رویی کشت سلولی کاندیدا به دست می‌آیند. آسپارتیل پروتئینازها، فسفولیپازها و پروتئین‌های شوک حرارتی از جمله‌ی آنتی‌ژن‌های ترشحی می‌باشند.

هنگامی که مخمرها به طریق مکانیکی یا شیمیایی شکسته و بقایای غیر محلول مانند دیواره‌ی سلولی، میتوکندری و ... به وسیله‌ی سانتریفیوژ جدا می‌شوند، مایع حاصل حاوی بسیاری از اجزا می‌باشد. این عصاره به عنوان سوپرناتانت مطرح می‌باشد که حاوی آنتی‌ژن‌های سیتوپلاسمی است. Manning و همکار تعداد ترکیبات آنتی‌ژنیک عصاره‌ی سلول‌های شکسته شده را ۱۶۸ عدد گزارش کردند (۳). انولاز و متالو پپتیداز آنتی‌ژن‌های ۴۷ کیلو دالتونی و مثال‌هایی از آنتی‌ژن‌های سیتوپلاسمی هستند.

ایمنی سلولی، مهمترین ساز و کار دفاعی ضد عفونت‌های قارچی است. پاسخ‌های Th1 مصونیت‌بخش و پاسخ‌های Th2 برای میزبان زیان‌بار است. عمل اصلی لنفوسیت‌های T در عفونت کاندیدایی، تولید سایتوکاین‌ها است که باعث افزایش خاصیت کشندگی کاندیدا توسط سلول‌های مونونوکلئر و پلی‌مورفونکلئر می‌شود. سلول‌های کمکی Th1 با تولید اینترفرون گاما و اینترلوکین ۲ نقش محافظتی در برابر کاندیدا دارند؛ در حالی که سلول‌های Th2 با تولید اینترلوکین ۴ و اینترلوکین ۱۰ با ایجاد بیماری و بروز آثار پاتولوژیک همراه می‌باشد (۴).

آنتی‌ژن‌های قارچی دیواره‌ی سلولی و سیتوپلاسمی می‌توانند پاسخ‌های اختصاصی ایمنی سلولی و هومورال را تحریک کنند. در این تحقیق نیز ما اثرات پروتئین‌های سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس بر روی لنفوسیت‌ها را مورد ارزیابی قرار دادیم.

روش‌ها

مخمر مورد استفاده: سوش استاندارد کاندیدا آلبیکنس با مشخصات ATCC 1032 تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

کشت انبوه: برای تولید انبوه از محیط کشت GYEP شامل گلوکز ۲ درصد، عصاره مخمر

www.mui.ac.ir

۰/۳ درصد و پپتون ۰/۱ درصد حاوی آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ IU/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) و کلرامفنیکل (۵۰ mg/ml) استفاده شد. سوسپانسیون از سوش استاندارد کاندیدا تهیه و به داخل ارلن‌ها اضافه گردید. سپس ارلن‌ها به انکوباتور شیکردار منتقل و با g × ۱۰۰ دور در دقیقه و حرارت ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. بعد از ۴۸ ساعت، نمونه‌ها با سانتریفیوژ یخچال‌دار (۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) با دور g × ۸۰۰ جمع‌آوری و ۳ مرتبه با آب مقطر استریل با همان دور شسته شد؛ سپس رسوب به دست آمده به فریزر منتقل شد.

خرد شدن سلول‌ها و تهیه‌ی عصاره‌ی سیتوپلاسمی: به منظور تفکیک دیواره‌ی سلولی مخمر از محتویات درون سیتوپلاسمی، از روش Elorza با پاره‌ای از تغییرات استفاده شد (۵). سوسپانسیونی به میزان ۴۰ میلی‌لیتر در PMSF ۰/۰۰۱ مولاریته تهیه و حجم‌های مساوی از آن و گلوله‌های شیشه‌ای با قطر ۰/۵ میلی‌متر در داخل لوله‌های آزمایشگاهی قرار گرفت تا به وسیله‌ی هم زدن لوله‌ها به کمک دستگاه ورتکس سلول‌های مخمری خرد شدند. بعد از شکسته شدن کامل سلول‌ها، جهت رسوب دادن دیواره‌ی سلولی از سانتریفیوژ یخچال‌دار (۴ درجه و g × ۱۲۰۰) به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. مایع رویی حاصل جهت تهیه عصاره‌ی سیتوپلاسمی به دستگاه اولتراسانتریفیوژ به مدت ۱ ساعت در دور g × ۱۰۰۰۰۰ انتقال داده شد و مایع رویی که حاوی عصاره‌ی سیتوپلاسمی بود، به درون لوله‌های مجزا ریخته شد و با استفاده از کیسه‌ی دیالیز عمل دیالیز صورت گرفت.

سنجش پروتئین‌ها: میزان پروتئین سیتوپلاسمی بعد از دیالیز با استفاده از روش Bradford اندازه‌گیری شد.

تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های سیتوپلاسمی: بدین منظور از روش SDS-PAGE استفاده شد.

کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون: به منظور تخلیص بیشتر پروتئین‌های سیتوپلاسمی از کروماتوگرافی باژل سفادکس G200 استفاده شد. بعد از قرار گرفتن ژل در بافر PBS، به آرامی درون ستون کروماتوگرافی ۸۰ × ۱ سانتی‌متر منتقل گردید. ۱/۵ گرم از نمونه‌ی تغلیظ شده به آرامی به سطح ژل اضافه و سپس بافر PBS ده میلی‌مولار توسط پمپ پریستالتیک به ستون اضافه گردید و سپس خروجی‌های ستون به میزان ۱ ml از هر لوله جمع‌آوری گردید و جذب نوری خروجی‌های ستون با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج nm ۲۸۰ خوانده شد.

الکتروفورز خروجی‌های ستون: مقدار غلظت قطعه‌ی سیتوپلاسمی استخراج شده از روش Bradford سنجیده شد و جهت تعیین وزن مولکولی خروجی‌ها از SDS-PAGE استفاده گردید.

حیوانات مورد مطالعه: ۱۵ سر موش BALB/C از جنس ماده با سن ۶ تا ۸ هفته‌ای از انیستیتو پاستور ایران خریداری و به مدت یک هفته جهت تطابق با محیط در حیوانخانه‌ی دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شد.

تهیه‌ی سوسپانسیون مخمری سلول‌های فعال (Active) و غیر فعال (Inactive): سوسپانسیون قارچی تهیه شده (۴×۱۰^{۴} سلول مخمری در ۱ میلی‌لیتر) جهت تهیه‌ی سلول‌های غیر فعال به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری ۵۶ درجه قرار داده شد و به همراه ادجوانت به حیوان تزریق گردید.

www.mui.ac.ir

حساس سازی حیوانات مورد مطالعه: حساس سازی حیوانات در پنج گروه مجزا و طبق جدول ۱ انجام شد. تمام گروه‌ها در روز بیست و یکم با روش قطع نخاعی کشته شدند.

جداسازی سلول‌های لنفوسیتی از طحال موش: طحال موش‌های نخاعی شده تحت شرایط استریل کامل در زیر هود خارج و به پلیت‌های ۶ سانتی‌متری حاوی PBS استریل منتقل شد. بافت طحال توسط قیچی تمیز به قطعات ریز تبدیل شد؛ سپس سوسپانسیون سلولی به دست آمده از مش عبور داده شد و با سوسپانسیون سلولی حاصل از تزریق PBS مخلوط گردید و در دور g ۳۰۰ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. دو بار عمل شستشو با PBS سرد انجام شد و سوسپانسیون بار دیگر در دور g ۳۰۰ در دمای ۴ درجه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به سلول‌های رسوب داده شده، ml ۵ بافر لیز کننده‌ی RBC افزوده و سپس سوسپانسیون به مدت ۵ دقیقه به آرامی تکان داده شد. سپس به سوسپانسیون مقدار ml ۱۰ PBS سرد افزوده شد تا سلول‌ها از شوک اسمزی خارج شوند. سلول‌ها سه بار با PBS شسته شد و سپس در دور g ۳۰۰ دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی جدا و لنفوسیت‌های جمع آوری شده با محیط کشت RPMI که حاوی FCS ۵ درصد بود، مخلوط گردید.

شمارش تعداد لنفوسیت‌ها: سلول‌ها با کمک لام نئوبار شمارش شد و به تعداد ۱×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر رسید.

تعیین درصد سلول‌های زنده (Viability): با استفاده از رنگ تریپان بلو طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Viability} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد سلول‌های زنده + تعداد سلول‌های مرده}} \times ۱۰۰$$

جدول ۱. نحوه‌ی حساس سازی حیوانات در پنج گروه مورد مطالعه

گروه‌ها	روز ۰	روز ۷	روز ۱۴
گروه I	سلول + آدجوانت کامل	سلول+آدجوانت ناقص	سلول‌های Inactive
۴ سر موش	SC	SC	IV
گروه II	سلول + آدجوانت کامل	سلول+آدجوانت ناقص	سلول‌های Active
۴ سر موش	SC	SC	IV
گروه III	آدجوانت کامل	آدجوانت کامل	آدجوانت کامل
۲ سر موش	SC	SC	IV
گروه IV	آدجوانت ناقص	آدجوانت ناقص	آدجوانت ناقص
۲ سر موش	SC	SC	IV
گروه V	سرم فیزیولوژی	سرم فیزیولوژی	سرم فیزیولوژی
	SC	SC	IV

www.mui.ac.ir

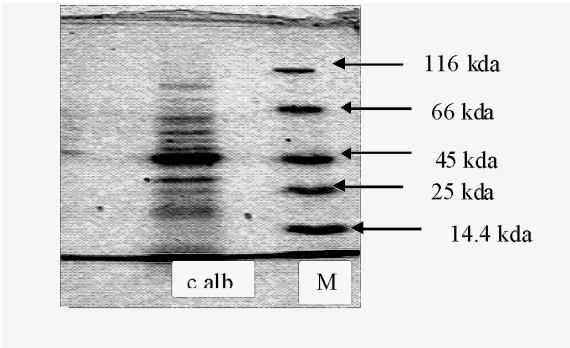
سنجش تکثیر لنفوسیتی با روش MTT: به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت که حاوی ۱۰۵ × ۲ سلول لنفوسیتی بود، اضافه شد. سپس آنتی‌ژن‌های عصاره‌ی خام با غلظت‌های ۸ µg، ۲۰ µg و ۴۰ µg و آنتی‌ژن‌های فراکشن‌های سیتوپلاسمی با غلظت ۵ µg، ۱۰ µg و ۲۰ µg به چاهک‌ها اضافه شد. PHA (فیتوهماگلوتینین) کنترل مثبت و RPMI کنترل منفی، حجم تمام چاهک‌ها به ۳۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس پلیت‌های آماده شده به انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد که حاوی CO2 به میزان ۵ درصد بود، منتقل و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. بعد از ۷۲ ساعت، مایع رویی چاهک‌ها، که در واقع سوپرناتانت کشت سلولی است، جهت اندازه گیری سیتوکاینها جمع آوری و به فریزر ۷۰- درجه منتقل شد. سپس مقدار ۲۰ میکرلیتر از محلول MTT به تمام حفرات اضافه گردید و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از ۴ ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده، با کمک سمپلر تمام محتویات داخل چاهک خارج گردید و سپس به تمام چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد و سپس OD چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ nm ثبت شد و جذب سلول‌های تحریک شده به جذب سلول‌های تحریک نشده به عنوان شاخص تحریکی اندازه گیری شد.

اندازه گیری سیتوکاین‌های IL-4 و IFN-γ: از کیت‌های الایزا با مشخصات mouse IL-4 Duoset DY404: و mouse IFN-γ Duoset DY485:- استفاده شد.

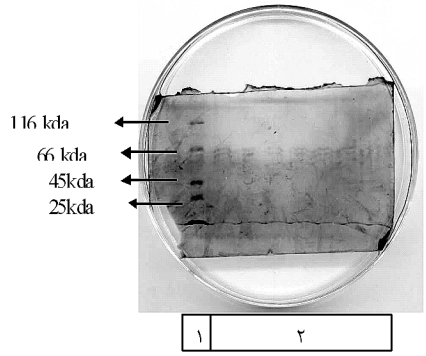
یافته‌ها

مقدار پروتئین به دست آمده از عصاره‌ی خام، ۰/۸ mg/ml و مقدار پروتئین به دست آمده از قطعه‌ی سیتوپلاسمی ۰/۱ mg/ml بود.

نتایج الکتروفورز عصاره‌ی خام سیتوپلاسمی و کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون: پروتئین‌های عصاره‌ی خام دارای ۸ باند با وزن مولکولی ۲۲/۵، ۹۱، ۸۰، ۵۸، ۴۱، ۳۸، ۲۶ و ۱۱۰ کیلودالتون (شکل ۱) بود و قطعه‌ی سیتوپلاسمی حاصل از ژل فیلتراسیون، وزن مولکولی بین ۶۶-۴۵ کیلودالتون را دارا بود (شکل ۲).



شکل ۱. الکتروفورز عصاره خام کاندیدا آلبیکانس
c.alb- باندهای پروتئینی کاندیدا آلبیکانس
M- باندهای پروتئینی مارکر



شکل ۲. الکتروفورز فراکشن سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکانس بعد از ژل فیلتراسیون
۱- باندهای پروتئینی مارکر
۲- باندهای پروتئینفراکنش سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکانس

www.mui.ac.ir

نتایج حاصل از آزمون MTT: نتایج حاصل با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه‌ی دو به دوی گروه‌ها، از روش LSD استفاده شد. آزمون در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ صورت گرفت. در گروه I، شامل موش‌های حساس شده با سلول‌های غیرفعال (Inactive)، مقایسه‌ی شاخص تحریکی (SI) هر یک از آنتی‌ژن‌های مورد استفاده با گروه شاهد و منفی دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود ($P < ۰/۰۰۱$). در این گروه، شاخص تحریکی در لنفوسیت‌های تحریک شده با عصاره‌ی خام بیشتر از قطعه‌ی سیتوپلاسمی بود. در گروه II، شامل موش‌های ایمن شده با سلول‌های فعال (Active)، مقایسه‌ی SI هر یک از آنتی‌ژن‌های مورد استفاده با گروه شاهد و منفی دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود ($P < ۰/۰۵$). در این گروه، SI لنفوسیت‌های تحریک شده با عصاره‌ی خام، تحریک بیشتری را نسبت به فراکشن سیتوپلاسمی نشان داد و از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری با آن بود ($P < ۰/۰۰۵$).

در مقایسه‌ی دو گروه I و II، لنفوسیت‌های موش‌های Balb/c حساس شده با سلول‌های فعال نسبت به سلول‌های غیرفعال در پاسخ به همه‌ی آنتی‌ژن‌های مورد استفاده شاخص تحریکی بالاتری از خود نشان داد.

در گروه‌های III، IV و V، مقایسه‌ی SI هر یک از آنتی‌ژن‌های مورد استفاده نسبت به گروه I و II دارای شاخص تحریکی پایین‌تری بود.

نتایج حاصل از آزمون بررسی ترشح سیتوکاینی: در این مطالعه از سنجش سایتوکاینی IFN-γ ترشحه از لنفوسیت‌های طحالی جهت بررسی چگونگی پاسخ‌های Th1 و از سنجش IL-4 جهت بررسی پاسخ‌های Th2 استفاده شد. غلظت IFN-γ و IL-4 با توجه به منحنی استاندارد محاسبه گردید. نتایج نشان داد که قطعه‌ی سیتوپلاسمی توانسته است مقادیر بیشتری از اینترفرون گاما نسبت به عصاره‌ی خام ترشح نماید و دارای اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل منفی و شاهد بوده است ($P < ۰/۰۰۱$).

نتایج بررسی غلظت سایتوکاین IL-4 در گروه‌های مختلف ۵ گانه نشان داد که در هیچ کدام از گروه‌ها میزان آن قابل اندازه گیری نبوده است.

بحث

امروزه گونه‌های کاندیدا به عنوان عوامل فرصت طلب، یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی می‌باشند (۶). مشاهدات بالینی، اهمیت مکانیسم‌های دفاع سلولی را در محافظت در مقابل عفونت‌های قارچی را تأیید می‌کند؛ چرا که شدیدترین عفونت‌های قارچی در بیمارانی دیده می‌شود که دچار نقص در سیستم ایمنی سلولی خود هستند. آنتی‌ژن‌های قارچی دیواره‌ی سلولی و سیتوپلاسمی می‌توانند پاسخ‌های اختصاصی ایمنی سلولی و هومورال را تحریک کنند. مطالعات متعددی بر روی تأثیرات آنتی‌ژن‌های دیواره‌ی سلولی و سیتوپلاسمی کاندیدا بر روی سیستم ایمنی انجام شده است. هدف ما از این تحقیق، بررسی تأثیرات پروتئین‌های سیتوپلاسمی بر روی پاسخ‌های ایمنی سلولی بود.

به منظور بررسی تأثیر عصاره‌ی خام و قطعه‌ی

www.mui.ac.ir

سیتوپلاسمی بر پاسخ‌های لنفوسیتی، ابتدا گروه‌های پنج‌گانه مدل حیوانی موش توسط سلول‌های کاندیدایی غیر فعال و فعال حساس گردید؛ نتایج نشان داد که گروه‌های I و II که به ترتیب توسط سلول‌های غیر فعال و فعال کاندیدا حساس شده بودند، در برابر آنتی‌ژن‌های عصاره‌ی خام و فراکشن سیتوپلاسمی پاسخ شدید از خود نشان دادند و پاسخ عصاره‌ی خام نسبت به قطعه بیشتر بود؛ می‌توان این یافته را به دلیل عدم خلوص عصاره‌ی خام دانست؛ چرا که بعد از انجام کروماتوگرافی، ناخالصی‌ها حذف شد و در نتیجه تحریک و تکثیر غیر اختصاصی لنفوسیت‌ها مشاهده نگردید. Torosantacci و همکاران نیز در آزمایش‌هایی که بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان توسط فراکشن‌های خالص شده از مانوپروتئین کاندیدا البیکنس انجام دادند، وجود یک فراکشن (F2) را که در آزمایشات تکثیر لنفوسیتی درحد عصاره‌ی خام توانست موجب تحریک لنفوسیت‌ها گردد، گزارش نمودند (۷).

Mencac و همکاران نیز در آزمایش‌هایی مشابه، موش‌هایی را توسط سلول‌های مخمری یک استرین از کاندیدا آلبیکنس با بیماری‌زایی ضعیف حساس نموده، مشاهده کردند که لنفوسیت‌های طحال موش‌های ایمن شده، در برابر فراکشن ۲ مانو پروتئین (MP-F2) پاسخ تکثیری شدیدی از خود نشان می‌دهد (۸). نتایج ما و مطالعات این محققین نشان می‌دهد که فراکشن‌های سیتوپلاسمی و دیواره‌ی سلولی، هر دو توانایی تحریک لنفوسیت‌ها را دارند.

یکی از روش‌های سنجش فعالیت سلول‌های T می‌تواند ارزیابی میزان ترشح سایتوکاین‌ها از طریق الایزا باشد که روشی حساس و دقیق و در حد نانوگرم است؛ بدین منظور، پس از تحریک لنفوسیت‌های استخراج شده از طحال موش‌های ایمن شده با آنتی‌ژن‌های به دست آمده از کاندیدا آلبیکنس و جمع آوری مایع رویی کشت سلول‌ها بعد از ۷۲ ساعت، از نظر وجود سایتوکاین‌های IL-4 و IFN-γ به لحاظ تعیین فعالیت Th1 و Th2 با روش الایزا، مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه، در مایع رویی کشت لنفوسیت‌ها در هیچ کدام از گروه‌ها غلظت IL-4 قابل اندازه گیری نبود؛ به نظر می‌رسد که پروتئین‌های سیتوپلاسمی عصاره‌ی خام و قطعه‌ی سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس موجب تحریک و ترشح IL-4 نشده است که این یافته نیز با مطالعات محققینی که پیشتر به بررسی الگوی ترشحی سایتوکاینی حاصل از تحریک پروتئین‌های دیواره‌ی سلولی و سیتوپلاسمی پرداخته‌اند، سازگاری دارد؛ بررسی‌های Urbani و همکاران نشان داد که مانوپروتئین کاندیدا آلبیکنس نتوانسته است باعث القای سنتز IL-10، IL-4 و TGF-β در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان گردد (۹). در مطالعه‌ی Scaringi و همکاران نیز کاندیدا البیکنس غیر فعال طی ۵ نوبت به موش تزریق شد و سپس سلول‌های حفره‌ی صفاقی از نظر بیان سایتوکاین‌ها توسط روش نورترن بلات مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که بیان mRNA مربوط به IL-5 و IL-4 مشاهده نگردید (۱۰).

در اندازه گیری ترشح اینترفرون گاما از لنفوسیت‌های تحریک شده، مطابق جدول ۲ و نمودار ۱ عصاره‌ی خام و قطعه‌ی سیتوپلاسمی مخمر کاندیدا آلبیکنس باعث ترشح IFN-γ در گروه‌های I و II شد.

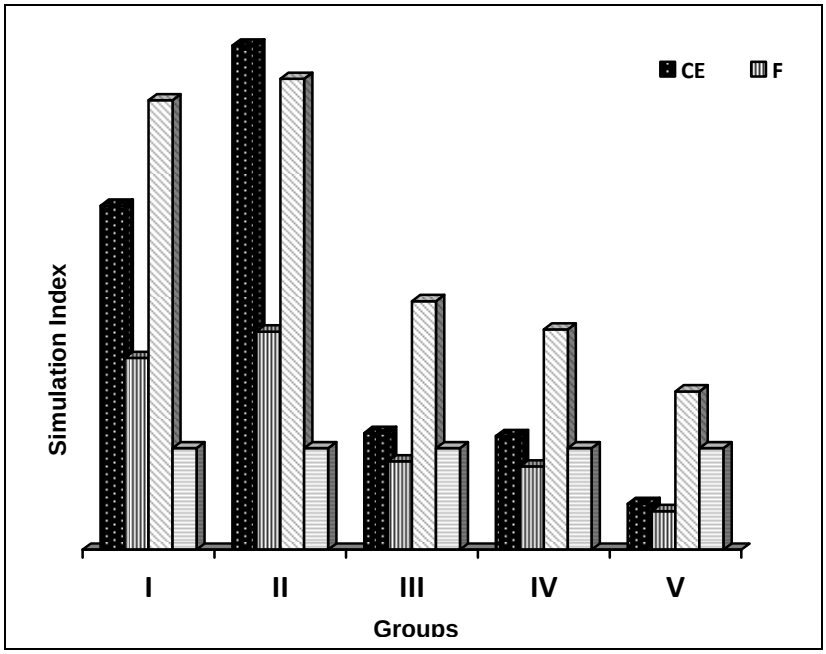
www.mui.ac.ir

در هر دو گروه، قطعات سیتوپلاسمی باعث القای ترشح بیشتر IFN-γ نسبت به عصاره‌ی خام شد که می‌تواند به علت خلوص بیشتر فراکشن نسبت به عصاره‌ی خام باشد. در مطالعه‌ی Nisini و همکاران نیز بعد از تحریک کلون‌های لنفوسیت T انسانی اختصاصی به وسیله‌ی MP-2، الگوی سایتوکاینی تیپ یک گزارش گردید (۱۱).

جدول ۲. نتایج حاصل از آزمایش‌های MTT با آنتی‌ژن‌های مختلف در گروه‌های مختلف پنج‌گانه موش Balb/C برای مخمر کاندیدا آلبیکانس

آنتی ژن	گروه‌ها				
	I	II	III	IV	V
CE	۰/۸۸ ± ۳/۳۹	۰/۵۳ ± ۴/۹۷	۰/۱۹ ± ۱/۱۵	۰/۱۵ ± ۱/۱۲	۰/۰۶ ± ۰/۴۵
F	۰/۳۱ ± ۱/۸۹	۰/۳۳ ± ۲/۱۵	۰/۰۴ ± ۰/۸۷	۰/۰۶ ± ۰/۸۲	۰/۱۲ ± ۰/۳۸
PHA	۱/۰۴ ± ۴/۴۳	۰/۵۱ ± ۴/۶۴	۰/۲۱ ± ۲/۴۵	۰/۱۱ ± ۲/۱۷	۰/۲۵ ± ۱/۵۶
RPMI	۰/۰۱ ± ۱/۰۰	۰/۰۲ ± ۱/۰۰	۰/۰۱ ± ۱/۰۰	۰/۰۱ ± ۱/۰۰	۰/۰۲ ± ۱/۰۰

CE: عصاره خام کاندیدا آلبیکانس
F: فراکشن سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکانس
I: گروه حساس شده با سلول های غیرفعال
II: گروه حساس شده با سلول های فعال
III: گروه شاهد ادجوانت کامل
IV: گروه شاهد ادجوانت ناقص
V: گروه کنترل منفی



نمودار ۱. نتایج حاصل از بررسی شاخص تحریکی لنفوسیت‌ها در مقابل آنتی‌ژن‌های مختلف در گروه‌های ایمن شده موش کاندیدا آلبیکانس

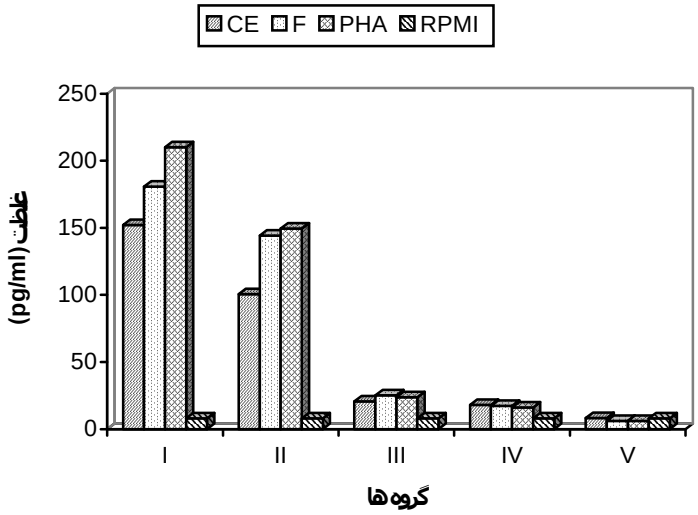
CE: عصاره خام کاندیداآلبیکانس
F: فراکشن سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکانس
I: گروه حساس شده با سلول های غیرفعال
II: گروه حساس شده با سلول های فعال
III: گروه شاهد ادجوانت کامل
IV: گروه شاهد ادجوانت ناقص
V: گروه کنترل منفی

www.mui.ac.ir

جدول ۳. نتایج بررسی غلظت سایتوکاین IFN-γ (pg/ml) در سوپرناتانت کشت لنفوسیت‌های گروه‌های پنجگانه موش Balb/C که به وسیله آنتی‌ژن‌های بدست آمده تحریک شده اند در مخمر کاندیدا آلبیکانس

آنتی ژن	گروه‌ها				
	I	II	III	IV	V
CE	۲/۸۴ ± ۱۵۲/۰۴	۰/۰۱ ± ۱۰۰/۵۲	۰/۰۷ ± ۲۰/۶۳	۰/۰۱ ± ۱۸/۰۲	۰/۰۱ ± ۸/۳۲
F	۰/۶۸ ± ۱۸۰/۷۳	۱/۳۶ ± ۱۴۴/۳۰	۰/۳۵ ± ۲۵/۲۶	۰/۰۶ ± ۱۷/۲۶	۰/۱۵ ± ۶/۱۵
PHA	۱/۲۷ ± ۲۰۹/۹۶	۰/۶۴ ± ۱۴۹/۵۶	۰/۷۱ ± ۲۳/۷۲	۰/۰۵ ± ۱۶/۰۸	۰/۰۱ ± ۶/۰۲
RPMI	۰/۰۱ ± ۸/۰۱	۰/۰۱ ± ۸/۰۱	۰/۰۱ ± ۸/۰۱	۰/۰۱ ± ۸/۰۱	۰/۰۱ ± ۸/۰۱

CE: عصاره خام کاندیداآلبیکانس
F: فراکشن سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکانس
I: گروه حساس شده با سلول های غیرفعال
II: گروه حساس شده با سلول های فعال
III: گروه شاهد ادجوانت کامل
IV: گروه شاهد ادجوانت ناقص
V: گروه کنترل منفی



نمودار ۲. میزان تولید IFN-γ (pg/ml) درگروه‌های مختلف آزمون توسط سلول‌های لنفوسیتی موش Balb/C در مخمر کاندیدا البیکانس

Mizutani و همکاران در مطالعه‌ای بر روی خاصیت ایمونوژنیسیته فراکشن غشایی کاندیدا آلبیکنس (CMA) بر روی مدل موشی مبتلا به عفونت قارچی سیستمیک، مشاهده نمودند که تحریک سلول‌های طحالی در موش‌های ایمن شده با CMA باعث ترشح IFN-γ و در نتیجه باعث فعال شدن ماکروفاژها و تولید نیتریک اکساید توسط آن‌ها می‌شود (۱۲). Paulovicova و همکاران در مطالعه‌ای بر روی خواص ایمونوژنتیکی مانان کاندیدا دابلی‌نینسیس بر روی مدل حیوانی خرگوش مشاهده کردند که حساس کردن خرگوش‌ها با مانان کونژوگه با سرم آلبومین انسانی (HAS)، باعث القای الگوی سایتوکاینی Th1 و ترشح IFN-γ می‌شود (۱۳)؛ در نتیجه با توجه به نتایج به دست آمده (ترشح IFN-γ و عدم ترشح IL-4)، قطعات سیتوپلاسمی کاندیدا آلبیکنس قادرند پاسخ‌های ایمنی سلولی را به سمت Th نوع یک (Th1) متمایل نمایند. با توجه به القای پاسخ‌های Th1 و **اهمیت** این زیر گروه از لنفوسیت‌های T در بروز پاسخ‌های ایمنی سلولی مناسب، مطلوب و کارا در برابر عفونت‌های کاندیدایی، شاید بتوان قطعات

www.mui.ac.ir

سیتوپلاسمی را به عنوان یک ترانسفر فاکتور با سایر عوامل افزایش دهنده‌ی تحریک سلول‌های عملگر ایمنی به عنوان مدل تأمین سیستم ایمنی مقاوم همراه با مصونیت یا پیش‌گیری بر ضد عفونت‌های کاندیدایی پیشنهاد کرد. در بررسی‌های اخیر، شیمی درمانی با داروهای ضد قارچی مانند فلوکونازول در انسان موجب به وجود آمدن استرین‌های مقاوم شده است و این احتمال وجود دارد که این مقاومت در مورد سایر داروهای ضد قارچی هم به وجود آید. ایمونوتراپی با اجزای داخل سلولی کاندیدا، مانند قطعات سیتوپلاسمی، می‌تواند به عنوان یک عامل پیشنهادی جهت جلوگیری از به وجود آمدن استرین‌های مقاوم و به عنوان یک عامل پیشنهادی پروفیلاکسی قبل از ایجاد عفونت در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی، در دریافت کنندگان پیوند مغز استخوان مورد استفاده قرار گیرد.

References

1. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. Clinical mycology. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2009.
2. Bromuro C, Torosantucci A, Gomez MJ, Urbani F, Cassone A. Differential release of an immunodominant 65 kDa mannoprotein antigen from yeast and mycelial forms of Candida albicans. J Med Veterinary Mycology 1994; 34(6): 447-59.
3. Manning M, Mitchell TG. Analysis of cytoplasmic antigens of the yeast and mycelial phases of Candida albicans by two-dimensional electrophoresis. J Infect Immun 1980; 30(2): 484-95.
4. Altamura M, Casale D,Pepe M, Tafaro A. Immune responses to fungal infections and therapeutic implications. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2001; 1(3): 189-97.
5. Elorza MV, Murgui A, Sentandreu R. Dimorphism in Candida albicans: contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cell walls. J Gen Microbiol 1985; 131(9): 2209-16.
6. Charles PE, Doise JM, Quenot JP, Aube H, Dalle F, Chavanet P, et al. Candidemia in critically ill patients: difference of outcome between medical and surgical patients. Intensive Care Med 2003; 29(12): 2162-9.
7. Torosantucci A, Palma C, Boccanera M, Ausiello CM, Spagnoli GC, Cassone A. Lymphoproliferative and cytotoxic responses of human peripheral blood mononuclear cells to mannoprotein constituents of candida albeicans. J Gen microbial 1990; 136: 2155-63.
8. Mencacci A,Torosantucci A, Spaccapelo R, Romani L, Bistoni F, Cassone A. A mannoprotein constituent of Candida albicans that elicits different levels of delayed-type hypersensitivity, cytokine production, and anticandidal protection in mice. Infect Immun 1994; 62(12): 5353-60.
9. Urbani F, Maleci A, La Sala A, Lande R, Ausiello CM. Defective expression of interferon-gamma, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in activated peripheral blood lymphocytes from glioma patients. J Interferon Cytokine Res 1995; 15(5): 421-9.
10. Scaringi L, Rosati E, Cornacchione P, Fettucciari K, Sabatini R, Biondi R, et al. Local and systemic immune response to inactivated Candida albicans in mice. Nat Immun 1995; 14(5-6): 234-49.
11. Nisini R, Romagnoli G, Gomez MJ, La Valle R, Torosantucci A, Mariotti S, et al. Antigenic properties and processing requirements of 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen target of anti-Candida human T-cell response, as disclosed by specific human T-cell clones. Infect Immun 2001; 69(6): 3728-36.
12. Mizutani S, Endo M, Ino-ue T, Kurasawa M, Uno Y, Saito H, et al. Immunization with the Candida albicans Membrane Fraction and in Combination with Fluconazole Protects against Systemic Fungal Infections. J Antimicrobial agents and Chemotherapy 2000; 44(2): 243-7.
13. Paulovicova E, Machova E, Tulinska J, ByPau lovicova E, Machova E, Tulinska J, Bystricky S. Cell and antibody mediated immunity induced by vaccination with novel Candida dubliniensis mannan immunogenic conjugate. Int Immunopharmacol 2007; 7(10): 1325-33.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School **Original Article**

June 2010, Vol 28, No 106 Received: 23.2.2009 Accepted: 28. 2.2010

Cytoplasmic Proteins Effects of Candida Albicans Upon Secreting Profile of Th1 and Th2 in Balb/c Mice

Rozita Heidari MSc[1], Mohammad Hussein Yadegari PhD[2],

Shahla Rodbar Mohammadi PhD[2], Maryam Rodbari MSc[1]

Abstract

Background: The incidence of mortality due to mycoses, particularly those caused by opportunistic fungi, has shown a marked increase in recent years. This happens especially in patients whose immune defense mechanisms is compromised by antibiotics, immunosuppressive, therapy, or severe underlying disease. In this study, the effects of cytoplasmic proteins of candida albicans on lymphocytes were examined.

Methods: Candida Albicans (Atcc 1023) was cultured in GYEP medium. Cells harvested by centerifugations were disrupted with glass beads. Disrupted yeast cells were centrifuged at 100'000 × g for 1 hour and supernatant was taken as cytoplasmic extract. SDS –PAGE was done to determine molecular weight. In order to further purify the cytoplasmic extract, gel filtration (G200) was used. Mice were divided in five groups: two groups were sensitized with active and inactive cells (both groups with adjuvant) and the other three groups were sensitized with complete adjuvant, incomplete adjuvant and physiologic serum. After seven days of the last injection, spleens were removed and lymphocytes were isolated. MTT assay was used in order to measure lymphocytes proliferation. IL4 and IFN-γ cytokines were thereafter measured by ELISA.

Findings: Among five groups of mice, antigens in groups 1 and 2 had the highest stimulation index and group 2 showed more stimulation. Studiy of cytokine profile showed that Th1 pattern in cell-mediated immune responses to the cytoplasmic proteins of candida albicans.

Conclusion: According to the results, cytoplasmic proteins modulate immune responses as inducers of lymphocyte proliferation and cytokine produce in vitro. So it can be suggested as a model for vaccine. Immunotheapy with interacellular candida constituents as cytoplasmic proteins will help to inhibit the emergence of resistant candida strains and to treat fungul infections caused by chemotherapeutics after infection.

Keywords: Candida albicans, Cytoplasmic proteins, Cytokine.

[1] MSc in Medical Mycology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Mycology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Corresponding Author: Mohammad Hussein Yadegari PhD, Email: yadegarm@modares.ac.ir

www.mui.ac.ir